

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULARNE OSNOVE CISTIČNE FIBROZE I SUVREMENI
TERAPIJSKI PRISTUPI

MOLECULAR BASIS OF CYSTIC FIBROSIS AND MODERN
THERAPEUTIC APPROACHES

SEMINARSKI RAD

Dorian Dragičević

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 2 |
| 2. STRUKTURA <i>CFTR</i> GENA I BIOKEMIJA <i>CFTR</i> PROTEINA..... | 3 |
| 3. KLASIFIKACIJA MUTACIJA I FENOTIP | 5 |
| 3.1. KLASA I..... | 6 |
| 3.2. KLASA II | 7 |
| 3.3. KLASA III..... | 7 |
| 3.4. KLASA IV | 8 |
| 3.5. KLASA V | 8 |
| 3.6. KLASA VI..... | 9 |
| 3.7. NASTANAK I EVOLUCIJA MUTACIJA..... | 11 |
| 3.8. UČESTALOST MUTACIJA | 12 |
| 3.9. MUTANTNI FENOTIP | 13 |
| 4. MOLEKULARNI TERAPIJSKI PRISTUPI..... | 16 |
| 4.1. GENSKA TERAPIJA I UREĐIVANJE GENOMA..... | 16 |
| 4.2. MODULATORI | 20 |
| 4.3.1. Pojačivači (eng. <i>Potentiators</i>)..... | 22 |
| 4.3.2. Ispravljačke molekule (eng. <i>Correctors</i>) | 24 |
| 4.3.3. Supresorski agensi (eng. <i>Read-through agents</i>) | 26 |
| 4.3.4. Amplifikatori (eng. <i>Amplifiers</i>) | 27 |
| 4.4. ZAMJENSKI IONSKI KANALI | 28 |
| 5. ZAKLJUČAK | 30 |
| 6. LITERATURA | 32 |
| 7. SAŽETAK | 36 |
| 8. SUMMARY | 36 |

1. UVOD

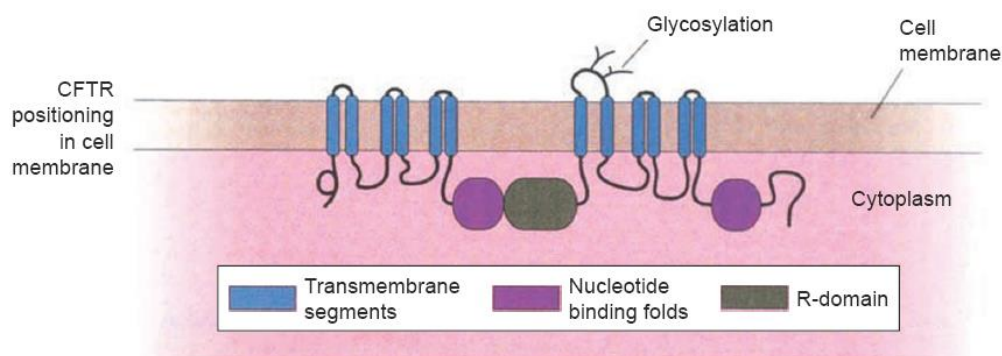
Interes brojnih molekularnih ispitivanja i suvremenih medicinskih terapijskih modela, koji se temelje na individualnom pristupu liječenja, omogućili su važnu prekretnicu u razumijevanju molekularnih osnova cistične fibroze (CF) i identifikaciji patofiziološke pozadine ove autosomalne, recesivne bolesti. Značajan pomak u shvaćanju temeljnog uzroka bolesti napravljen je od razdoblja 1930.-ih godina kada je Dorothy Hansine Andersen prva uspješno opisala i dokumentirala opsežan spektar kliničke slike uzrokovane cističnom fibrozom (Krvavac i Nayak, 2016) omogućivši razvojni put brojnim terapijskim tehnikama. Inicijalni klinički pristup prvih nekoliko desetljeća nakon definiranja simptomatskog spektra bolesti temeljio se primarno na tretmanima koji su indirektno pokušavali ublažiti posljedice bolesti uključujući metode poput prehrambenih dodataka, fizioterapijskih pristupa te upotrebe antibiotskih i protuupalnih lijekova (Derichs, 2013). Iako su navedene metode omogućile kvalitetniji i dugoročniji život osoba oboljelih od ove smrtonosne bolesti, genska identifikacija mutacijskih promjena i početak njihove klasifikacije 1989. godine (Kerem i sur., 1989) unaprijedili su razumijevanje temeljnog uzroka bolesti i načina liječenja omogućivši razvoj modernih metoda zasnovanih na individualiziranom, genski utemeljenom pristupu. Kao značajna bolest primarno bijele rase, CF uključuje više od 1900 alelnih varijanti i zahvaća velik broj ljudi (Coutelle, 2015.). Razvoj i identifikacija visoko specijaliziranih lijekova i metoda liječenja usmjerenih na točno određenu kategoriju mutacija jedini je pristup koji osigurava povećanje efikasnosti terapijske primjene uvodeći time cističnu fibrozu u eru personalizirane medicine (Derichs, 2013). Idejna okosnica ovog rada je prikazati molekularne i patofiziološke osnove cistične fibroze uz glavni naglasak širokog spektra klasifikacija mutacija i evolucijskog značaja. Naglasak je stavljen primarno na abnormalnosti u staničnoj funkciji, naročito stanica respiratornog sustava, čiji gubitak funkcije je osnovni uzrok visoke stope smrtnosti. Suvremeni terapijski pristupi opisani u ovom radu daju teorijski prikaz prednosti upotrebe personaliziranog pristupa u liječenju cistične fibroze ističući osnovne probleme kojima se svaki od modela susreće pritom pokušavajući pristupiti bolesti primarno na staničnoj razini, a ne s medicinskog, simptomatskog aspekta.

2. STRUKTURA *CFTR* GENA I BIOKEMIJA *CFTR* PROTEINA

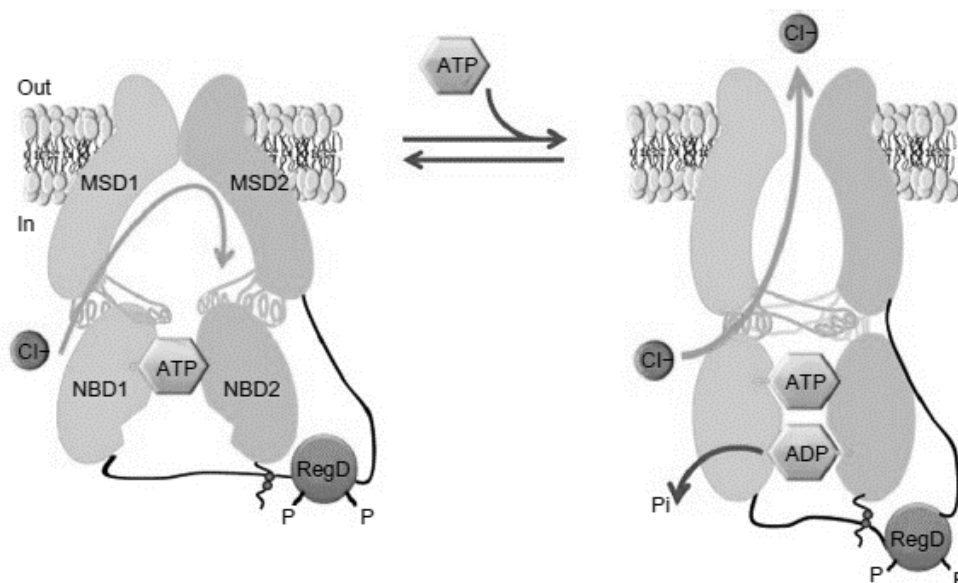
Cistična fibroza jest monogenska, autosomalna, recesivna bolest uzrokovana različito klasificiranim mutacijama unutar *CFTR* (eng. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) gena i njemu priključenih regulatornih regija presudnih u održavanju potrebne razine genske ekspresije. *CFTR* gen se sastoji od 26 intronskih i 27 eksonskih regija ukupne duljine oko 250 kb te je smješten na dugom kraku kromosoma 7 na poziciji kategoriziranoj lokusom q31.2 (Moskowitz i sur., 2005). U normalnim uvjetima izvanstanični signali stimuliraju ekspresiju *CFTR* gena koji kodira za odgovarajući transmembranski proteinski produkt (*CFTR* protein) lokaliziran na apikalnoj membrani epitelnih stanica prvenstveno pluća, gušterače, jetre i probavnog sustava. Sinteza samoga proteina odvija se na ribosomima vezanim na hrapavom endoplazmatskom retikulumu (ER) te se nezreli polipeptidni lanac prvotno smata unutar ER-a. Primarne postranslacijske modifikacije poput potrebnih glikozilacija odvijaju se u ER-u i Golgijevom kompleksu te se konačni zreli proteinski produkt usmjerava prema specifičnim epitelnim stanicama gdje djeluje kao karakteristični prijenosni kanal odgovoran za održavanje elektrokemijske ravnoteže (Derichs, 2013).

CFTR protein je primjer posebnog ABC (eng. *Adenosine triphosphate-binding cassette*) prenositelja koji upotrebljava energiju dobivenu hidrolizom ATP-a za prijenos primarno kloridnih (Cl^-) i bikarbonatnih iona (HCO_3^-) niz elektrokemijski gradijent iz citoplazme u izvanstanični prostor (Vallières i Elborn, 2019). Strukturnim analizama zaključeno je da je *CFTR* protein selektivni ionski kanal uključen u prijenos i regulaciju koncentracija soli i vode na apikalnoj membrani epitelnih stanica pri čemu uz direktnu kontrolu prijenosa Cl^- i HCO_3^- utječe i na efikasnost reapsorpcije natrijevih iona (Na^+) i sekreciju kloridnih iona iz stanice modulirajući pritom aktivnost natrijevih i alternativnih kloridnih kanala s kojima je funkcionalno povezan (Pittman i Ferkol, 2015). Značajnije modifikacije navedenog proteina destabiliziraju ravnotežne koncentracije elektrolita i osmotski gradijent utječući pritom i na sam membranski stanični potencijal te pH vrijednost sustava. Kristalografskim i biokemijskim analizama definirano je da se *CFTR* protein sastoji od 1480 aminokiselina organiziranih u pet karakterističnih domena (Slika 1.) pri čemu su dvije transmembranske domene (TMD1/TMD2), sastavljene svaka od šest alfa zavojnica (M1-6/M7-12), odgovorne za stvaranje pore ionskoga kanala i njegovu selektivnost dok dvije citoplazmatske nukleotid-vezujuće domene (NBD1/NBD2) omogućuju vezanje ATP-a odgovornog za dimerizaciju navedenih domena te konformacijske promjene i provodnost cjelokupnog kanala (Derichs, 2013). Važna je i

prisutnost regulatorne domene (R) na citoplazmatskoj strani stanične membrane na kojoj se temeljno odvija fosforilacijska reakcija specifičnih aminokiselinskih bočnih ogranaka pomoću cAMP ovisne protein kinaze (protein kinaza A, PKA) i pravilno pozicioniranje ATP-a na nuklotid-vezujuće domene što značajno ubrzava reakcije otvaranja ionskog kanala i funkcionalni prijenos odgovarajućih iona (Kirk i Wang, 2011). N i C-terminalni krajevi CFTR proteina orijentirani su prema citoplazmi stanice te se pretpostavlja da zajedno s regulatornom domenom utječu na sam mehanizam otvaranja ionskog kanala kao i reguliranje interakcija s drugim staničnim proteinima (Vallières i Elborn, 2019). Mehanizam samog prijenosa primarno zahtijeva fosforilaciju R domene pomoću PKA koja time stimulira dimerizaciju NBD1/NBD2 koja se konačno postiže vezanjem ATP-a u odgovarajuća aktivna mjesta svake pojedinačne domene (Slika 2.). Takve lokalne strukturne promjene prenose se i na transmembranske dijelove proteina, TMD1/TMD2, pri čemu nastaje otvoreno konformacijsko stanje koje omogućuje selektivni prijenos Cl^- i HCO_3^- u izvanstanični prostor. Daljnjom hidrolizom ATP-a dolazi do odvajanja dimernih struktura NBD1/NBD2 što regulira zatvaranje pore kanala za prijenos spomenutih elektrolita (Kirk i Wang, 2011).



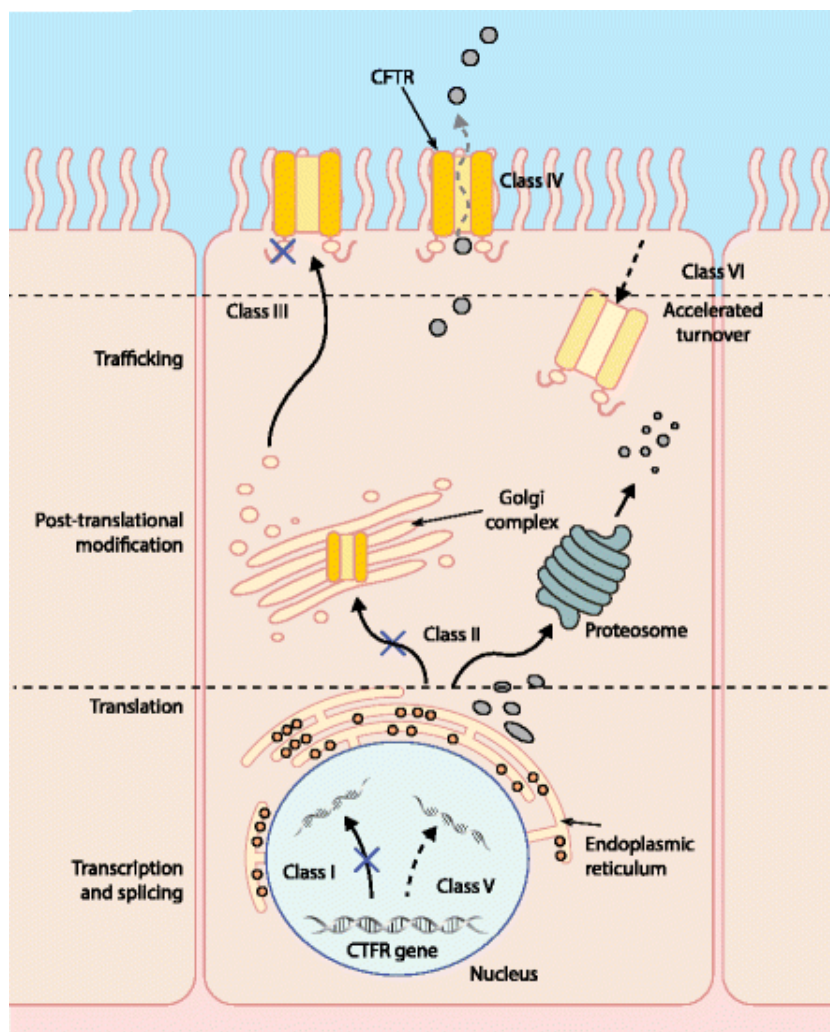
Slika 1. Pojednostavljeni strukturni prikaz CFTR proteina koji se sastoji od transmembranskih segmenata (plavo), nukleotid-vezujućih regija (ljubičasto) i regulatorne (R) domene (sivo) pri čemu je sam protein smješten na apikalnoj strani epitelnih stanica. (Preuzeto i prilagođeno iz Chaudary, 2018.)



Slika 2. Konformacijska promjena CFTR ionskog kanala za vrijeme prijenosa Cl^- . Pojednostavljeni model prikazuje CFTR protein u uvjetima mirovanja (lijevo) i u aktiviranom stanju (desno). (Preuzeto i prilagođeno iz Vallières i Elborn, 2019.)

3. KLASIFIKACIJA MUTACIJA I FENOTIP

Danas je otkriveno i opisano više od 1900 različitih varijanti sekevence *CFTR* gena pri čemu je utjecaj pojedinih varijanti na funkcionalnost ionskog kanala ograničena samo na relativno mali broj. Time se implicira da samo mali broj specifičnih mutacija uzrokuje fiziološke promjene karakteristične za cističnu fibrozu dok su funkcionalne posljedice ostalih rijetkih varijacija *CFTR* gena nepoznate ili ne uzrokuju poremećaje okarakterizirane simptomima cistične fibroze (Derichs, 2013). Mutacije unutar *CFTR* gena ili pripadajućih regulatornih regija koje određuju stupanj ekspresije uzrokuju kvantitativne ili kvalitativne poremećaje na različitim razinama sintetskog puta. Radi preglednosti velikog broja mutacijskih promjena one su kategorizirane u šest karakterističnih klasa na temelju učinka na ekspresiju, strukturu i funkcionalnost samoga proteina (Slika 3., Slika 4.).



Slika 3. Unutarstanični put sinteze i lokalizacija CFTR proteina u epitelnim stanicama respiratornog sustava uz prikaz osnovnih mutacijskih klasa i njihovog učinka na ekspresiju (transkripcija, prekrajanje i translacija), posttranslacijske modifikacije, unutarstanični transport i stabilnost proteina: Klasa I-Klasa VI. (Preuzeto i prilagođeno iz Brodlić i sur., 2015.)

3.1. KLASA I

Klasa I mutacija predstavlja kvantitativni poremećaj koji uzrokuje nemogućnost sinteze cjelovitog i funkcionalnog proteina prvenstveno zbog besmislenih mutacija ili mutacija u pomaku okvira čitanja u *CFTR* genu koje dovode do uvođenja preuranjenog terminacijskog kodona u transkripcijskom procesu. Tako dobiveni skraćeni i nestabilni RNA segment se uglavnom degradira već prije izlaska iz stanične jezgre onemogućujući u potpunosti translacijski proces ili uzrokuje sintezu skraćenog i time nefunkcionalnog proteinskog produkta

koji prepoznaju šaperoni u ER-u i induciraju njegovu razgradnju (Pittman i Ferkol, 2014). Najznačajniji primjer mutacije klasificirane u ovu skupinu je Gly542X (G542X), besmislena mutacija uzrokovana preuranjenim STOP kodonom koja rezultira ranim translacijskim poremećajem i skraćenim CFTR proteinom. Ostale mutacije koje se ubrajaju u ovu skupinu, a uzrokuju potpuni nedostatak CFTR proteina uzrokovane su kromosomskim delecijama te mutacijama u procesiranju mRNA molekula onemogućujući time ispravno izrezivanje intronskih sljedova (Derichs, 2013; Brodlie i sur., 2015).

3.2. KLASA II

Klasa II mutacija također predstavlja kvantitativni poremećaj uzrokovan problemom u pravilnom procesu smatanja proteina u karakterističnu tercijarnu strukturu zbog čega dolazi do unutarstanične degradacije proteina prije nego što se uspije transportirati do apikalne strane plazmatske membrane. Iako je CFTR protein pravilno sintetiziran, pogrešne mutacije ili delecije nukleotida koji definiraju isti okvir čitanja (eng. *in-frame deletions*) ometaju pravilno smatanje, funkcionalnost i prijenos proteina na staničnu površinu što inicijalno usmjerava takve proteine s abnormalnom funkcijom prema degradacijskim staničnim putevima (degradacija pomoću proteasoma), a ukoliko isti dopiju do stanične membrane brzo se eliminiraju i razgrađuju (Pittman i Ferkol, 2014). Najpoznatiji primjer iz Klase II jest mutacija Phe508del (F508del), najzastupljenija promjena *CFTR* gena koju karakterizira delecija tri nukleotida što rezultira gubitkom fenilalanina na poziciji 508 koja je sastavni element NBD1 regije. Ta delecija uzrokuje nepravilno smatanje narušavajući pritom unutarstanični put prijenosa proteina usmjeren prema plazmatskoj membrani i njegovu pogrešnu lokalizaciju. Stanični mehanizmi za degradaciju i mehanizmi kontrole kvalitete ubrzo prepoznaju nefunkcionalni produkt i eliminiraju ga prije dodatnih postranslacijskih modifikacija u Golgijevom kompleksu i ugradnje na ciljno mjesto na staničnoj membrani (Vallières i Elborn, 2019.)

3.3. KLASA III

Klasa III mutacija predstavlja kvalitativni poremećaj uzrokovan nedostatkom odgovora na stimulaciju CFTR proteina pomoću cAMP-a i pripadajuće protein kinaze A (De la Hoz i sur., 2018). Sve mutacije kategorizirane u navedenu skupinu zahvaćaju regije NBD1/NBD2 onemogućujući vezanje ili pak prepoznavanje ATP-a čime ne dolazi do karakterističnih

konformacijskih promjena cjelokupnog proteina što rezultira poremećenom provodnošću ionskog kanala i reduciranim prijenosom kloridnih iona (Vallières i Elborn, 2019). U ovoj klasi većina promjena uzrokovana je pogrešnim mutacijama unutar *CFTR* gena koje dovode do supstitucija ključnih aminokiselina koje sudjeluju u poticanju aktivnosti CFTR proteina. Njihova zamjena ne utječe na sintetski niti transportni proces nastajućeg proteinskog produkta, ali zato uzrokuje slab ili nikakav odgovor na ATP aktivaciju značajno smanjujući brzinu kemijske reakcije otvaranja ionskog kanala. Najpoznatiji primjer iz ove skupine jest Gly551Asp (G551D), pogrešna mutacija koja zamjenjuje aminokiselinu glicin s pozitivno nabijenom aminokiselinom asparatom (Derichs, 2013) utječući primarno na promjenu elektrostatskih interakcija u regiji NBD proteina koja rezultira smanjenom mogućnošću ATP stimulacije i konformacijske promjene smanjujući pritom efikasnost prijenosa iona.

3.4. KLASA IV

Klasa IV mutacija predstavlja kvalitativni poremećaj kod kojeg je CFTR protein ispravno lokaliziran na apikalnoj strani epitelnih stanica, ali ima problem u prijenosu elektrolita kroz poru ionskog kanala. Pogrešne mutacije uglavnom rezultiraju zamjenom ključnih aminokiselina lokaliziranih u TMD1/TMD2 regiji proteina koje su odgovorne za prepoznavanje ključnih iona na temelju njihove veličine i naboja. Zamjena pozitivno nabijenih aminokiselina u nenabijene direktno utječe na selektivnost i mogućnost transporta primarno kloridnih iona (Vallières i Elborn, 2019). Iako je proteinski produkt definiran strukturnom stabilnošću i pravilnom staničnom lokalizacijom, promjene u transmembranskim regijama uzrokuju poremećeni prijenosni kapacitet pri čemu otvorenost ionskog kanala ne omogućuje efikasnu selektivnost i prijenos elektrolita (Pittman i Ferkol, 2015). Najznačajniji primjeri mutacija ove skupine su Arg117His (R117H) i Arg347Pro (R347P) pri čemu je vidljiv gubitak pozitivno nabijenog aminokiselinskog ogranka arginina važnog u procesu selekcije i prijenosa negativno nabijenih kloridnih iona onemogućujući sustavu dovoljnu efikasnost transporta.

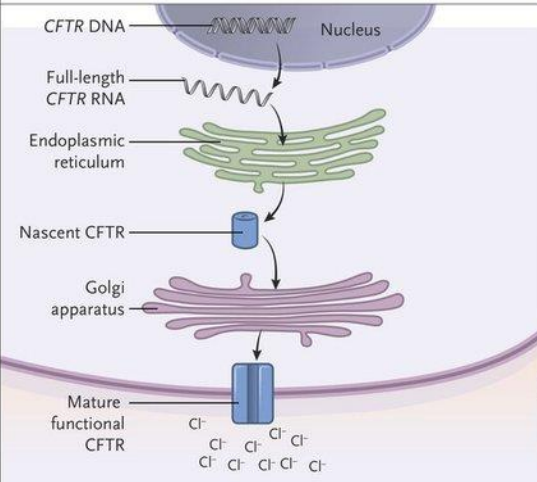
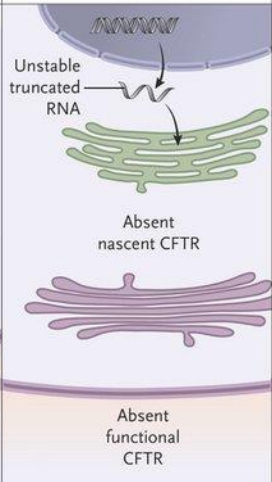
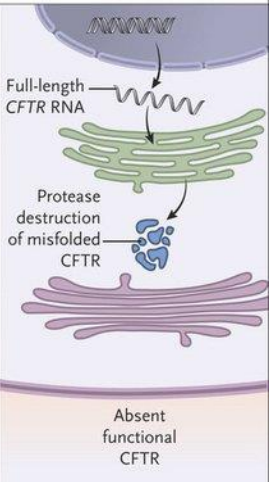
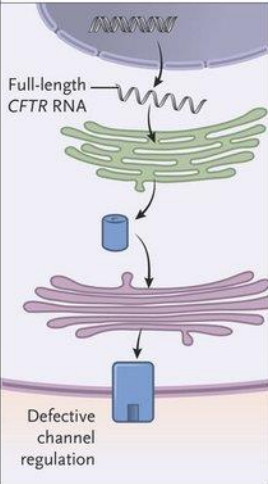
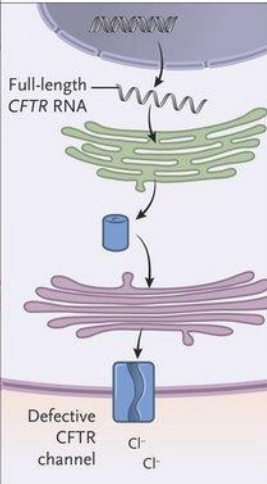
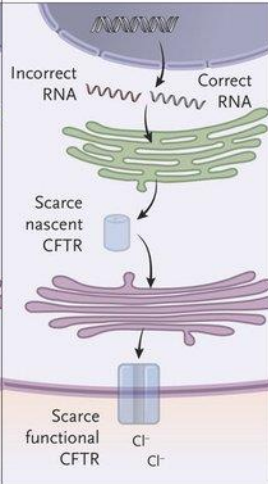
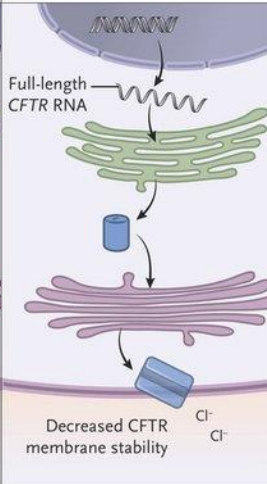
3.5. KLASA V

Klasa V mutacija definirana je smanjenom količinom CFTR proteina na apikalnoj strani stanice što je posljedica uglavnom intronskih mutacija koje utječu na postranskripcijsku doradu i prekrajanje RNA transkripta ili pogrešnim mutacijama u eksonskim regijama ili pak

promotorskim sljedovima reducirajući pritom efikasnost proteinske sinteze (Derichs, 2013; Brodlić i sur., 2015). Mutacije klasificirane u ovu skupinu uglavnom utječu na proces prekrajanja stvarajući pritom normalne, ali i aberatne proteine koji se eliminiraju. Stoga je ukupna količina funkcionalnih proteina smanjena. Cjelokupna CFTR funkcija jest narušena zbog nedostatnog broja proteina na staničnoj površini, međutim ugrađeni proteini imaju normalnu strukturu i transportnu funkciju.

3.6. KLASA VI

Klasa VI mutacija ima narušenu ravnotežu između sinteze i degradacije CFTR proteina uzrokovane uglavnom mutacijama u blizini N i C-terminalne regije samoga proteina koje su važne za proces ugradnje proteinskog produkta u plazmatsku membranu, njegovu stabilnost te provodnost elektrolita i interakciju s drugim molekulama (Pittman i Ferkol, 2015). Mutacije klasificirane u ovu skupinu variraju uglavnom od pogrešnih mutacija do delecija, ali i insercija koje dovode do stvaranja funkcionalnog, ali nestabilnog proteina sa skraćenim vremenom poluživota (Vallières i Elborn, 2019) pritom uzrokujući kvantitativni poremećaj. On se manifestira u smanjenom broju funkcionalnih CFTR kanala u staničnoj membrani. Ciljanim delecijama aminokiselina koje su locirane na C-terminusu otkriveno je da one nisu esencijalne za proces smatanja i značajno ne utječu na konačnu funkcionalnost i strukturnu uniformnost, ali znatno reduciraju stabilnost čitavog proteina, a sukladno tome i njegovo vrijeme poluživota (Haardt i sur., 1999).

| Class | Normal | | I | II |
|----------------------------|---|---|--|---|
| CFTR defect | — | | No functional CFTR protein | CFTR trafficking defect |
| Type of mutation | — | | Nonsense Frameshift Canonical splice | Missense Amino acid deletion |
| Specific mutation examples | — | | Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G→T | Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr |
| Mechanism |  | |  |  |
| Class | III | IV | V | VI |
| CFTR defect | Defective channel regulation | Decreased channel conductance | Reduced synthesis of CFTR | Decreased CFTR stability |
| Type of mutation | Missense Amino acid change | Missense Amino acid change | Splicing defect Missense | Missense Amino acid change |
| Specific mutation examples | Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn | Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp | 3849+10kbC→T 2789+5G→A 3120+1G→A 5T | 4326delTC Gln1412X 4279insA |
| Mechanism |  |  |  |  |

Slika 4. Klasifikacija mutacijskih promjena *CFTR* gena s naznačenim glavnim karakteristikama svake skupine, tipovima mutacija i prikazom najučestalijih ishoda: Klasa I-Klasa VI. (Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.grepmed.com/images/61/modulatortherapy-cysticfibrosis-pathophys-mutations-pharm-cftr-pulm>).

3.7. NASTANAK I EVOLUCIJA MUTACIJA

Znanstvenici danas procjenjuju kako se originalna mutacija *CFTR* gena, koja je mogla uzrokovati simptome karakteristične za cističnu fibrozu, prvotno pojavila prije 52 000 godina na području Sjeverne Europe kao posljedica prethodne prirodne selekcije onih pojedinaca koji su bili heterozigoti za navedenu mutacijsku promjenu (Morral i sur., 1994). Danas postoji više različitih hipoteza koje objašnjavaju prednost heterozigotnosti *CFTR* gena na opstanak organizama izloženim pojedinim bakterijskim infektivnim bolestima. Jedna široko prihvaćena hipoteza predlaže kako je razlog održavanja relativno visoke razine heterozigota u populaciji selektivna prednost nositelja kod zaraze patogenom bakterijom *Vibrio cholerae*. Za razumijevanje povezanosti kolere i cistične fibroze potrebno je analizirati specifičan egzotoksin kojeg izlučuje sama bakterija, a veže se upravo na CFTR ionski kanal lociran na apikalnoj strani epitelnih stanica probavnog sustava. Interakcijom egzotoksina i ionskog kanala stimulira se njegova aktivnost što rezultira prekomjernim izlučivanjem kloridnih iona u lumen crijeva dovodeći pritom do promjene koncentracijskog gradijenta. Posljedično, voda osmotskim procesom prati put sekrecije klorida te izlazeći iz epitelnih stanica dolazi do njezinog gubitka (Gabriel i sur., 1994). Također, voda se ne može reapsorbirati iz lumena crijeva u epitelne stanice zbog hipertoničnosti izvanstanične tekućine u odnosu na unutarstaničnu, što rezultira dijarejom, dehidracijom organizma i konačno smrću. U slučaju strukturne i fiziološke nefunkcionalnosti CFTR kanala uzrokovane nekom od mutacija, toksin bakterije *Vibrio cholerae* se ne može specifično vezati na ionski kanal. Mnogi znanstvenici smatraju kako je epidemija kolere selektirala prvenstveno one pojedince s jednim mutiranim *CFTR* alelom dajući im evolucijsku prednost koja se mogla prenositi na sljedeće generacije i omogućiti njihov opstanak u vremenu epidemija (Goodman i Percy, 2005). Istraživanja daju sljedeća tri dokaza koji podržavaju navedenu teoriju: postojanje većeg broja različitih mutacijskih promjena unutar *CFTR* gena, visoka frekvencija mutiranog alela u populaciji i činjenica da se radi o vrlo staroj mutaciji koja se pojavila prije okvirno 52 000 godina. Jedini prigovor teoriji koji još nije razjašnjen jest činjenica da se kolera u Europi pojavila tek nedavno, krajem 18. stoljeća, što znači da se selektivni pritisak u vidu epidemija pojavio tek nedavno. U vezi s tim problemom, javila se interpretacija da su heterozigotni organizmi za *CFTR* gen otporniji na simptome tifusa obzirom da je pokazano da CFTR ionski kanal djeluje i kao receptorska molekula za ulazak bakterije *Salmonella typhi* u epitelne stanice probavnog kanala. Eksperimentalna istraživanja provedena na miševima divljeg tipa i heterozigotima s mutacijskom promjenom Phe508del ukazuju da se čak 86% manje bakterija *Salmonella typhi* uspjelo translocirati u

gastrointestinalni submukozni sloj heterozigotnih mutanta, nego jedinki divljeg tipa. Time se može zaključiti da smanjene razine CFTR proteina u heterozigotima mogu umanjiti osjetljivost organizama na tifus (Pier i sur., 1998). Danas postoje i istraživanja koja povezuju opstanak originalne mutacije i same cistične fibroze u europskim zemljama sa zaštitom heterozigotnih organizama od dijareje uzrokovane intolerancijom na laktozu prije nego što je došlo do evolucijske pojave povoljnih mutacija koje su omogućile toleranciju na laktozu (Modiano i sur., 2007). Isto tako pojedini znanstvenici objašnjavaju da nosioci *CFTR* mutacije imaju i određeni stupanj rezistencije na tuberkulozu pri čemu se hipoteza temelji na činjenici da mutacija gena uzrokuje smanjenu i nedovoljnu aktivnost enzima arilsulfataze koja je u funkcionalnom obliku potrebna za virulentnost bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, a njezin nedostatak omogućuje rezistentnost na patogenost i na eksprimiranje fenotipa specifičnog za tuberkulozu (Tobacman, 2003).

3.8. UČESTALOST MUTACIJA

Zastupljenost pojedinih klasa mutacija jako varira unutar proučavanih populacija. Globalnom analizom, prema podacima Fundacije cistične fibroze (eng. *Cystic Fibrosis Foundation*) iz 2017. godine, identificirano je preko 1900 mutacijskih promjena unutar *CFTR* gena i pripadajućih regulatornih regija pri čemu okvirno samo 25 mutacija ima učestalost u populaciji veću od 0,5%. Daleko najprisutnija mutacija u ljudskoj populaciji jest F508del iz prethodno opisane Klase II mutacija s alelnom učestalošću od čak 90% (<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>). Osim navedene alelne varijante još samo 5 *CFTR* mutiranih alela ima populacijsku frekvenciju veću od 2%. Sve te mutacije pojedinačno pripadaju različitim klasama: G542X, G551D, R117H, N1303K, W1282X (Derichs, 2013). Zastupljenost i kategorizacija ostalih značajnih mutacijskih promjena detaljnije je prikazana u preuzetom tabličnom prikazu Fundacije cistične fibroze (Tablica 1). U europskim zemljama 1 od 2000 - 3000 novorođenčadi ima simptome specifične za cističnu fibrozu (Derichs, 2013.) te su od ranog djetinjstva podvrgnuti različitim terapijskim pristupima i personaliziranoj medicini kako bi im se omogućila bolja kvaliteta i dugotrajnost života.

Tablica 1. Zastupljenost 25 najučestalijih *CFTR* mutacija kod ljudi s dijagnosticiranom cističnom fibrozom u 2017. godini. (Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>).

| Prevalence of the 25 Most Common CFTR Mutations in People with CF Seen in 2017 | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| CFTR Mutation | | | Mutation Class | Number of Individuals | Percent of All People with CF |
| Legacy Name | cDNA Name | Protein Name | | | |
| F508del | c.1521_1523delCTT | p.Phe508del | 2 | 25,276 | 85.8 |
| G542X | c.1624G>T | p.Gly542X | 1 | 1,352 | 4.6 |
| G551D | c.1652G>A | p.Gly551Asp | 3 | 1,320 | 4.5 |
| R117H | c.350G>A | p.Arg117His | 4 | 867 | 2.9 |
| N1303K | c.3909C>G | p.Asn1303Lys | 2 | 709 | 2.4 |
| W1282X | c.3846G>A | p.Trp1282X | 1 | 669 | 2.3 |
| R553X | c.1657C>T | p.Arg553X | 1 | 541 | 1.8 |
| 3849+10kbC>T | c.3717+12191C>T | | 5 | 515 | 1.7 |
| 621+1G>T | c.489+1G>T | | 1 | 476 | 1.6 |
| 1717-1G>A | c.1585-1G>A | | 1 | 469 | 1.6 |
| 2789+5G>A | c.2657+5G>A | | 5 | 410 | 1.4 |
| 3120+1G>A | c.2988+1G>A | | 1 | 327 | 1.1 |
| D1152H | c.3454G>C | p.Asp1152His | 4 | 271 | 0.9 |
| 5T | c.1210-12[5] | | 5 | 237 | 0.8 |
| I507del | c.1519_1521delATC | p.Ile507del | 2 | 234 | 0.8 |
| R1162X | c.3484C>T | p.Arg1162X | 1 | 224 | 0.8 |
| 1898+1G>A | c.1766+1G>A | | 1 | 213 | 0.7 |
| 3659delC | c.3528delC | p.Lys1177SerfsX15 | 1 | 207 | 0.7 |
| 2184insA | c.2052_2053insA | p.Gln685ThrfsX4 | 1 | 196 | 0.7 |
| G85E | c.254G>A | p.Gly85Glu | 2 | 192 | 0.7 |
| R347P | c.1040G>C | p.Arg347Pro | 4 | 177 | 0.6 |
| 3272-26A>G | c.3140-26A>G | | 5 | 176 | 0.6 |
| A455E | c.1364C>A | p.Ala455Glu | 5 | 170 | 0.6 |
| L206W | c.617T>G | p.Leu206Trp | 4 | 170 | 0.6 |
| R334W | c.1000C>T | p.Arg334Trp | 4 | 164 | 0.6 |

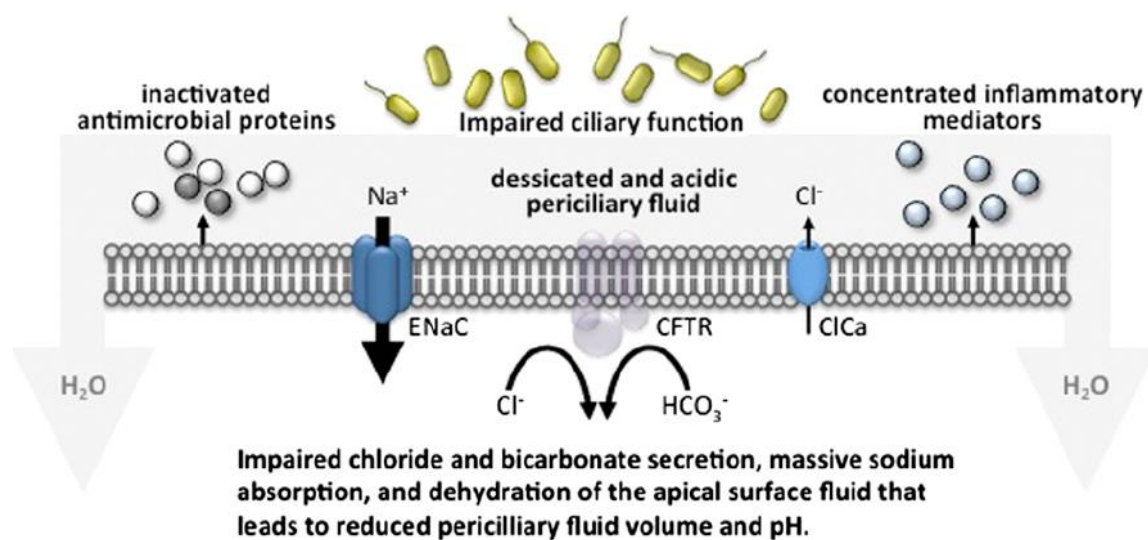
3.9. MUTANTNI FENOTIP

Posljedice mutacijskih promjena u *CFTR* genu te pridruženim regulatornim regijama jasno rezultiraju brojnim poremećajima na različitim razinama unutar staničnog sintetskog puta proteinskog produkta. Analizirajući posljedice smanjene aktivnosti ili nedostatne funkcionalnosti CFTR proteina na dišni sustav, mogu se uočiti zajedničke fenotipske karakteristike koje su istovjetne svim poremećajima neovisno o kategorizaciji s temeljnim razlikama u intezitetu i stupnju letalnosti. U normalnim uvjetima funkcionalni CFTR protein, lokaliziran na apikalnoj strani epitelnih plućnih stanica, osigurava optimalni volumen, elektrolitni sastav i pH vrijednost površinske tekućine dišnih puteva koja je presudna u zaštiti epitelnih stanica kao i cjelovitog respiratornog sustava. Homeostaza površinske respiratorne

tekućine jest važna za učinkovito mukocilijarno čišćenje dišnih puteva od makromolekularnih čestica i patogenih organizama prisutnih u zraku predstavljajući prvu razinu obrane od infektivnog napada. Površinska respiratorna tekućina također sadrži specifične antimikrobne peptide te fagocitne stanice koje pojačavaju učinak kompleksnog respiratornog urođenog imunskog odgovora (Vallières i Elborn, 2019).

Patofiziološki utjecaj cistične fibroze na respiratorni sustav danas se objašnjava prevladavajućom paradigmom poznatom kao hipoteza smanjenog volumena (eng. *low-volume hypothesis*) koja temeljno pretpostavlja da smanjeni volumen površinske tekućine onemogućuje efikasno mukocilijarno pročišćavanje dišnih kanala uzrokujući direktan gubitak važnog urođenog dišnog obrambenog mehanizma uz istovremenu aktivaciju upalnog odgovora zbog razvoja prvenstveno bakterijskih infekcija (Davies i sur., 2007; Clunes i Boucher, 2007). Abnormalna funkcionalnost ili smanjena aktivnost CFTR proteina na molekularnoj razini uzrokuje redukciju sekrecije kloridnih i bikarbonatnih iona u lumen dišnoga sustava. Simultano dolazi do povećanja reapsorpcije pozitivno nabijenih natrijevih iona niz elektrokemijski gradijent te vode osmozom u smjeru veće koncentracije otopljenih tvari u stanice smanjujući fluidnost i djelotvornost epitelne respiratore tekućine. Navedeno fiziološko stanje povećava viskoznost i gustoću površinske tekućine, a sam nedostatak bikarbonatnih iona prisutnih u lumenu smanjuje pH vrijednost sustava. U tom procesu HCO_3^- ima važnu funkciju u održavanju acido-bazne ravnoteže tekućine, aktivaciji antimikrobnih faktora te je esencijalan element u odvajanju mucina, proteina presudnih u formiranju dehidriranog mukoznog sloja na površini epitelne stanice (Sheppard i Davis, 2019). Također, eksperimentalno je dokazano kako kiseli uvjeti mijenjaju način eliminacije bakterija u respiratornom sustavu tako što dolazi do smanjenja aktivnosti obrambenih peptidnih molekula i frekvencije cilijarne pokretljivosti stimuliranjem proteaznih aktivnosti brojnih enzimatskih sustava (Slika 5.) (Vallières i Elborn, 2019). Zaključno, nefunkcionalnost tog urođenog imunskog odgovora predstavlja povoljan fiziološki uvjet za bakterijsku kolonizaciju (posebice *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*) koja posljedično uzrokuje neutrofilnu aktivaciju i upalnu reakciju lučenjem citokina (Pittman i Ferkol, 2015). Takav imunosni odgovor uglavnom je neuspješan te rezultira konstantnom kliničkom i kroničnom infekcijom praćenom nepovratnom degeneracijom respiratornog tkiva, organa i u konačnici cjelokupnog respiratornog sustava. Cistična fibroza jest multisistemska bolest koja osim na respiratorni sustav može djelovati i na gastrointestinalni, reproduktivni, endokrini i koštani sustav. Međutim, temeljni uzrok povećane stope smrtnosti je nefunkcionalnost ponajprije respiratornog sustava stoga su mnogi

molekularni terapijski pristupi i metode personalizirane medicine danas usmjerene na reduciranje negativnog efekta CF na dišni sustav, glavni uzrok smrtnosti oboljelih osoba.



Slika 5. Patofiziologija epitelnih stanica respiratornog sustava okarakterizirana je alternativnom anionskom sekrecijom, hiperapsopcijom Na^+ i dehidracijom površinske respiratorne tekućine uz povezanu promjenu pH vrijednosti sustava te sastava i viskoznosti mukoznog sloja. Prikazana nefunkcionalnost CFTR proteina učinkovito spječava sekreciju Cl^- i HCO_3^- , a istovremeno utječe i na porast apsorpcijske aktivnosti alternativnih natrijevih kanala (tamno plavo) kao i smanjenja sekrecije klorida putem drugih kloridnih kanala (svijetlo plavo). Posljedice poremećaja jesu stanična hipertoničnost koja dovodi do povećanog unosa vode osmozom, ali i inaktivacija antimikrobnih proteina površinske tekućine, povećanje viskoznosti mukoznog sloja, nefunkcionalnost mukocilijarnog čišćenja kao i porast koncentracije upalih molekula unutar respiratornog sustava. (Preuzeto i prilagođeno iz Pittman i Ferkol, 2015.)

4. MOLEKULARNI TERAPIJSKI PRISTUPI

Molekularni terapijski pristupi u liječenju cistične fibroze utemeljeni su na dizajnu strategija koji pokušavaju riješiti uzrok poremećaja na staničnoj razini temeljno respiratornog sustava koji predstavlja glavni uzrok smrtnosti oboljelih osoba. Terapijski modeli prikazani u ovom radu uključuju suvremeni individualizirani pristup koji se zasniva na prilagođavanju liječenja točno specifične klase mutacija kako bi efikasnost pristupa bila maksimalna (Tablica 2.). Navedeni terapijski tretmani, usmjereni na povrat funkcionalnosti mutiranih stanica respiratornog sustava, danas predstavljaju tri poznata koncepta djelovanja na staničnoj razini uključujući unos ispravnog gena i/ili modifikaciju postojećeg alela, aktivaciju i stimulaciju proteinske sinteze te upotrebu alternativnih prijenosnih puteva dok su ostale biotehnološke i medicinske metode usmjerene na ublažavanje simptoma bolesti izazvanih transportnom nefunkcionalnošću.

Tablica 2. Klasifikacija *CFTR* mutacija s prikazanim primjerima suvremenih terapijskih pristupa za svaku od navedenih skupina (Preuzeto i prilagođeno iz De la Hoz i sur., 2019.)

| | Class I | Class II | Class III | Class IV | Class V | Class VI |
|----------------------|---|---|--|--|---|---|
| Mutation type | No protein synthesis Nonsense, frameshift. | Folding defect Missense, deletion. | Channel opening defect Missense, Amino acid change. | Ion transport defect Missense, Amino acid change. | Protein synthesis reduction Splicing. | Protein half-life reduction Missense, Amino acid change. |
| Therapy | Gene therapy | Lumacaftor, Ivacaftor, Tezacaftor Gene therapy | Ivacaftor Gene therapy | Ivacaftor Gene therapy Tezacaftor (specific mutations) | Gene therapy Tezacaftor (specific mutations) | Gene therapy |

4.1. GENSKA TERAPIJA I UREĐIVANJE GENOMA

Genska terapija jest molekularni terapijski pristup koji pokušava uspostaviti ponovnu funkcionalnost stanica, narušenu mutacijom gena, unosom ispravnih alelnih varijanti. Ostale poznate metode liječenja temelje se primarno na popravku posljedica mutacija u nasljednoj uputi koje uzrokuju nefunkcionalnosti u sintetskom putu CFTR proteina (npr. modulatorske molekule, alternativni ionski kanali) ili pomažu u reduciranju makroskopskih simptomatskih

poremećaja stoga u teorijskom aspektu genska terapija te nove tehnike uređivanja genoma predstavljaju značajan medicinski potencijal u iskorjenjivanju prirodne povijesti bolesti uključujući i cističnu fibrozu. Prednost genske terapije u liječenju cistične fibroze jest mogućnost uspostavljanja ponovne normalne fiziološke funkcije epitelnih stanica respiratornog sistema bez obzira na tip i klasifikaciju mutacijske promjene, a temelji se na unošenju primarno DNA, a ponekad i RNA molekula koje kodiraju za ispravan CFTR protein ili pak prenošenjem kompleksa (npr. ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) koji omogućuju popravak i uređivanje genoma ciljnih stanica (Alton i sur., 2016). Olakotna okolnost u ovakvom pristupu liječenja cistične fibroze jest činjenica da se radi o monogenskoj bolesti pri kojoj su i heterozigotne jedinke fenotipski normalne te je stoga dovoljan popravak samo jednog mutiranog alela, jednostavna anatomski dostupnost ciljnih stanica dišnog sustava te činjenica što su pluća oboljelih osoba normalna pri rođenju pružajući potencijalni vremenski okvir za ovaj terapijski pristup (Burney i Davies, 2012). Unatoč tome što genska terapija ima značajan potencijal za liječenje, eksperimentalno je ustanovljeno da ipak postoje mnogi problemi koji još uvijek onemogućuju kliničku i komercijalnu primjenu.

Jedan od glavnih kliničkih ograničenja uključuje dizajniranje vektora i efikasnost njegovog unosa u organizam pri čemu su danas na raspolaganju nevirusni i virusni vektori. Nevirusni pristupi upotrebljavaju kationske liposome, DNA i mRNA nanočestice te plazmidne DNA molekule kao vektore (Burney i Davies, 2012) s time da su prednosti svih ovih primjera, sigurnost upotrebe i mogućnost ponavljanja doziranja, ipak umanjene smanjenom efikasnošću transporta i pozitivnim staničnim odgovorom (Slika 6.). Virusni vektori su se pokazali kao najefikasniji jer mogu izbjeći imuni odgovor, inficirati stanice i efikasno isporučiti promijenjene gene od interesa (Marangi i Pistritto, 2018) uz uvjet da virus prethodno mora biti modificiran kako bi izgubio patogenost. Adenovirusi i adeno-povezani virusi (AAV) imaju prirodni tropizam za respiratorne epitelne stanice, međutim unatoč toj pozitivnoj karakteristici navedeni vektori nisu prošli pretklinička ispitivanja za liječenje cistične fibroze zbog brojnih nespecifičnih nuspojava te neočekivanog induciranog imunogenog odgovora koji je pritom umanjio učinkovitost prijenosa i reprogramiranja mutiranih stanica. Recentne studije ipak su pokazale mogućnost povećanja AAV tropizma, smanjenja imunogenosti te porasta ekspresijske razine *CFTR* gena epitelnih stanica uz dugotrajnije zadržavanje unutar respiratornog sustava omogućujući daljnji razvoj ovih vektorskih modela (Marangi i Pistritto, 2018). S druge strane, lentivirusni vektori danas su u grupi vodećih terapijskih agensa iz razloga što mogu transducirati stanice koje imaju sposobnost diobe, ali i one koje se ne mogu dijeliti. Omogućuju

infekciju točno ciljanih stanica i integraciju u genom domaćina pri čemu ne izazivaju intenzivan imunski odgovor (Burney i Davies, 2012; Donnelley i Parsons, 2018).

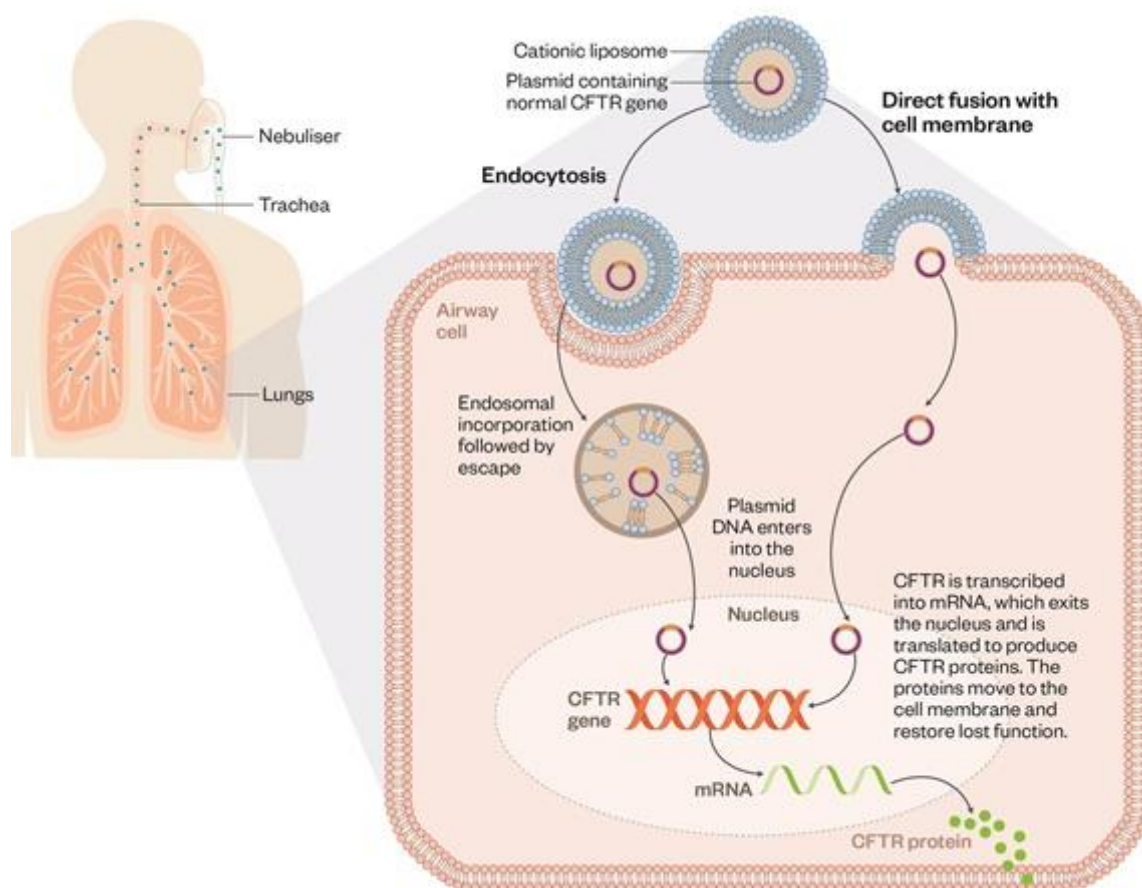
Drugi osnovni problem medicinske upotrebe genske terapije s kojim se suočavaju znanstvenici jesu izvanstanične i unutarstanične barijere respiratornog sustava koje uključuju biološke i fizikalne prepreke mukoznog površinskog sloja respiratorne tekućine, mukocilijarno čišćenje i imunski odgovor, dok unutar stanice jezgrina membrana otežava unos ispravnih alelnih varijanti koje bi mogle ponovno uspostaviti funkcionalnost stanica (Marangi i Pistritto, 2018). Normalni fiziološki obrambeni mehanizmi dišnog sustava razvili su se kako bi spriječili formiranje infekcije uzrokovane konstantnom aerosolnom bakterijskom i virusnom invazijom te predstavljaju prirođeni ograničavajući čimbenik u efikasnosti prijenosa gena od interesa do respiratornih epitelnih stanica. Mukozni površinski sloj u normalnim uvjetima zadržava vektorske molekule koje se potom uklanjaju procesom mukocilijarnog čišćenja čime je onemogućeno ostvarivanje specifičnih interakcija između vektora i odgovarajućih receptorskih molekula na staničnoj površini (Donnelley i Parsons, 2018). Taj efekt je još intenzivniji kod osoba s cističnom fibrozom zbog povećane viskoznosti i gustoće mukoznog sloja. Genski vektori moraju biti dizajnirani tako da mogu proći kroz gusti viskozni sloj površinske tekućine i doći primarno do epitelnih, ali i drugih ciljnih stanica poput matičnih stanica koje predstavljaju subpopulaciju bazalnih stanica respiratornog sustava vraćajući temeljnu fiziološku funkcionalnost dišnog sustava. Tijesni spojevi između površinskih stanica također predstavljaju zaštitu sustava od patogena razdvajajući luminalni stanični sloj od dubljih dijelova u kojem su inkorporirane matične stanice. Jedan općeprihvaćeni pristup u rješavanju navedenog problema uključuje kombinaciju vektora (uglavnom adenovirusa i lentivirusa) u kombinaciji s lizofosfatidilkolinom (LPC), koji je normalan sastojak plućnog surfaktanta s funkcijom postupne permeabilizacije tijesnih spojeva, solubilizacije mukoznog sloja čime je omogućen lakši pristup transportiranog gena do različitih staničnih tipova (Donnelley i Parsons, 2018). Pogodnost pojedinih animalnih modelnih organizama za genska terapijska ispitivanja, načini detekcije povratka funkcije epitelnih stanica te zahtjev za većom vektorskom produkcijom u svrhu primjene navedene tehnologije na ljudima samo su neke od zapreka koje onemogućuju trenutni pomak genske terapije ka kliničkim istraživanjima. Iako je u posljednjih nekoliko godina primjena genske terapije postala izrazito ograničavajuća metoda zbog činjenice da prijenos gena nailazi na brojne zapreke, organizacija Konzorcij Ujedinjenog Kraljevstva za gensku terapiju cistične fibroze (eng. *The UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium*) je nedavno pokrenula program primjene genske terapije s ciljem procjene upotrebe nevirusnih

liposomskih

vektora

(http://www.cfgenetherapy.org.uk/genetherapy/article/CF_Gene_Therapy_Clinical_Trials)

čime je potvrđen koncept da takva terapija može omogućiti medicinsku korist osobama s različitim CFTR genotipovima.



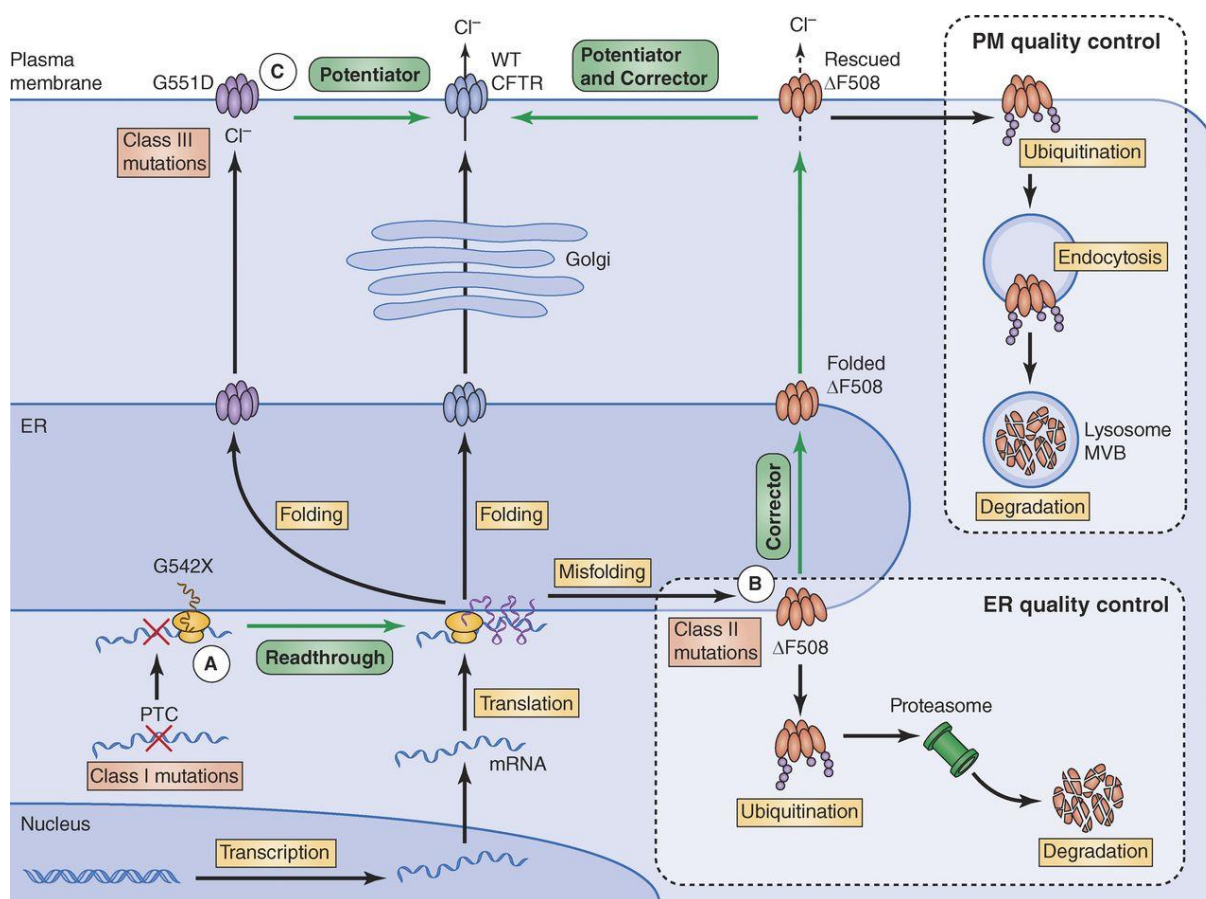
Slika 6. Princip djelovanja genske terapije uz upotrebu liposomskih čestica za prijenos gena do respiratornih stanica osoba oboljelih od cistične fibroze. Primjer prikazuje kationski liposom s modificiranim plazmidom koji sadrži funkcionalni *CFTR* gen koji se unosi u epitelne stanice dišnog puta direktnom fuzijom membrana ili endocitozom. Oslobođeni plazmid iz endosoma može ući u jezgru stanice i pod djelovanjem transkripcijskih faktora stanice domaćina stvarati funkcionalne mRNA molekule koje kodiraju za nativni CFTR protein nadoknađujući time izgubljenu funkciju navedenih stanica. (Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.pharmaceutical-journal.com/news-and-analysis/features/developing-gene-therapy-to-treat-cystic-fibrosis-challenges-and-successes/20201275.article>).

Dok genska terapija uključuje prijenos funkcionalnog gena do određenih stanica kako bi se zamijenilo djelovanje neaktivnoga gena, suvremene tehnike uređivanja genoma podrazumijevaju izrazito precizan, direktan popravak mutacijskih promjena DNA molekula. Zahvaljujući razvoju ovih tehnika danas je moguće intervenirati na molekularnoj razini s izrazito visokim stupnjem preciznosti izrezujući pritom DNA slijed na točno definiranim mjestima uz reverziju funkcionalnih nukleotidnih varijanti koje bi omogućile potpuni povrat izgubljene stanične funkcije. Popravak mutacijskih promjena na originalnim lokusima teorijski omogućuje dvije prednosti nad ostalim tehnikama, a one uključuju zadržavanje kontrole genske ekspresije, već postojećim, endogenim promotorima koji osiguravaju prirodnu regulaciju i dugotrajnu ekspresijsku aktivnost te smanjenje mogućih negativnih efekata unosa strane DNA i nespecifične inducirane mutageneze (Marangi i Pistritto, 2018). Uređivanje genoma postiže se kompleksima koji sadrže nukleaze (tzv. „molekularne škare“) i odgovarajuće proteinske DNA-specifične domene, a danas poznate tehnologije uključuju ZFN (eng. *Zinc Finger Nucleases*), TALEN (eng. *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) i CRISPR/Cas9 bakterijski sustav tipa II (eng. *Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated*) pri čemu se posljednji trenutno smatra najučinkovitijom metodom za modifikaciju genoma (Xia i sur., 2019). S obzirom da cistična fibroza obuhvaća širok spektar mutacija, razvoj navedenih strategija omogućio bi individualizirani terapijski pristup koji bi osigurao da liječenje bude točno dizajnirano i prilagođeno specifičnim mutacijama osoba oboljelih od cistične fibroze. Upotreba tehnologije CRISPR/Cas9 sustava u terapijske svrhe trenutno je u prekliničkim ispitivanjima, a dosad dobiveni eksperimentalni rezultati upućuju na svijetlu budućnost upotrebe ove tehnologije kao temeljnog oblika personalizirane medicine.

4.2. MODULATORI

Alternativni terapijski pristup u liječenju cistične fibroze na molekularnoj osnovi uključuje razvoj genotipski specifičnih malih molekula koje funkcioniraju kao lijekovi koji modificiraju funkciju *CFTR* gena i njegovog proteinskog produkta (Coutelle, 2015). Ovaj model terapije se prvenstveno temelji na poznavanju klasifikacije pojedinih mutacija i upotrebi odgovarajućih specijaliziranih i individualiziranih molekula usmjeravajući pritom njihovo djelovanje na točno određeni mutacijskih tip što predstavlja svojevrsan oblik personalizirane

medicine. Danas su poznata tri glavna pristupa modulatora koji uključuju skupine pojačivača (eng. *potentiators*), ispravljačkih molekula (eng. *correctors*) i produkcijskih ispravljačkih molekula odnosno tzv. supresorskih agensa (eng. *production correctors/ read-through agents*) koji ispravljaju inicijalni stanični poremećaj ili djeluju na povećanje aktivnosti nefunkcionalnog proteinskog produkta (Brodie i sur., 2015) čime omogućuju normalnu biogenezu i unutarstaničnu translokaciju bez direktnog učinka na gensku i strukturnu abnormalnost (Slika 7.). Nedavno se spominje i razvoj još jedne skupine modulatora tzv. amplifikatora (eng. *amplifiers*) koji dodatno povećavaju učinkovitost djelovanja ostalih lijekova ovog terapijskog pristupa ukoliko se međusobno kombiniraju stvarajući tzv. novu generaciju modulatora (<https://www.cff.org/Research/Developing-New-Treatments/CFTR-Modulator-Types/>). Iako postoje još određeni potencijalni modulatorski pristupi poput stabilizatora (eng. *stabilizers*) i antisense-oligonukleotidnih terapija (Lopes-Pacheco, 2016), oni su uglavnom još uvijek u početnim fazama razvoja te su fokusirani primarno na tretiranje klasa mutacija koje ne uzrokuju snažan fenotip i ne zahvaćaju veliki broj ljudi (klasa V i VI) zbog čega nisu spomenuti u ovome radu. Najznačajniji agensi koji se trenutno nalaze u kasnijim stadijima kliničkih ispitivanja te pokazuju obećavajuću djelotvornost u individualiziranom medicinskom pristupu prikazani su u sljedećem dijelu teksta.



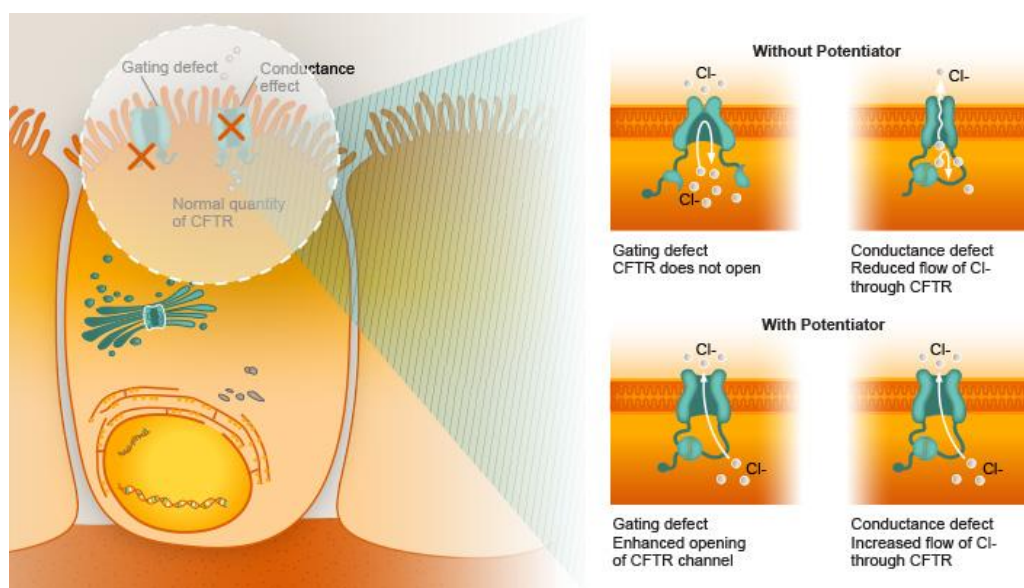
Slika 7. Unutarstanični mehanizmi i princip djelovanja nekih od modulatorskih molekula poput pojačivača (eng. *potentiators*), ispravljačkih molekula (eng. *correctors*) i supresorskih agensa (eng. *read-through agents*). A) Osnovni princip djelovanja supresorskih agensa, koji primarno djeluju na Klasu I mutacija, jest da osiguravaju nastavak transkripcije preko preuranjenih terminacijskih STOP kodona čime nastaje cjeloviti polipeptidni lanac. B) Prikazan je proces kontrole kvalitete proteinske sinteze u ER-u pri čemu korektori imaju važnu ulogu u pomaganju pravilnog smatanja proteina i njegove translokacije koji su inicijalno narušeni zbog mutacija svrstanih u Klasu II spječavajući pritom prekomjernu degradaciju nepavilno smotanih proteina u proteasomu. C) Pojačivači imaju funkciju popravka prijenosnih abnormalnosti pravilno pozicioniranih proteina uzrokovanih uglavnom mutacijama Klase III dok kombinirani tretman s pojačivačima i ispravljačkim molekulama osigurava još efikasniji povrat stanične funkcije. (Preuzeto i prilagođeno iz Okiyoneda i Lukacs, 2012.)

4.3.1. Pojačivači (eng. *Potentiators*)

Pojačivači su molekule koje uzrokuju porast funkcije CFTR ionskih kanala te se primarno primjenjuju u liječenju Klasa III i IV mutacija (Brodlie i sur., 2015) koje karakterizira

pravilna lokalizacija, ali strukturna nefunkcionalnost CFTR proteina zbog čega sam protein ne reagira na cAMP stimulaciju ili mu je pak onemogućen pravilan ionski prijenos zbog strukturnih abnormalnosti (Slika 8.). Upravo ova skupina agensa predstavlja najjednostavniji i ujedno najuspješniji pristup u pospješivanju povratka funkcije proteina koji imaju poremećaj u otvaranju ionskog kanala i sličnih strukturnih promjena (Brodie i sur., 2015).

Ivacaftor (VX-770) jest reprezentativni lijek ove skupine molekula koji funkcionira kao CFTR pojačivač usmjeren prvenstveno na poremećaj izazvan mutacijom Gly551Asp (Solomon i sur., 2015). Učinkovitost i primjenjivost ovog lijeka otkrivena je selekcijom više od 228 000 potencijalnih terapijskih spojeva, a daljnja *in vitro* evaluacija pokazala je značajan porast vjerojatnosti otvaranja ionskog kanala i transporta kloridnih iona, povećanje volumena i fluidnosti površinske respiratorne tekućine te gotovo potpuni povrat frekvencije ciliarnog pokretanja epitelnih stanica. Uspješnost dobivenih prekliničkih rezultata omogućili su pojavu brojnih kliničkih ispitivanja koji su trenutno u kasnijim fazama razvoja s ciljem prilagodbe i masovne primjene pojačivačkih molekula u terapiji što šireg spektra mutacijskih promjena (Van Goor i sur., 2009; Brodie i sur., 2015).



Slika 8. Mehanizam djelovanja pojačivača (eng. *potentiators*). Prikazan je pravilno pozicionirani protein s osnovnim poremećajem u procesu otvaranja ionskog kanala i reduciranim prijenosom kloridnih iona uzrokovanim konformacijskim abnormalnostima (gore) pri čemu je vidljivo kako dodatak potencijatora potiče otvaranje CFTR kanala uzrokujući pritom povećani protok kloridnih iona i povrat funkcije (dolje). (Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.cftr.info/clinical-management-of-cf/cftr-modulators/potentiators-correctors-and-production-correctors/>).

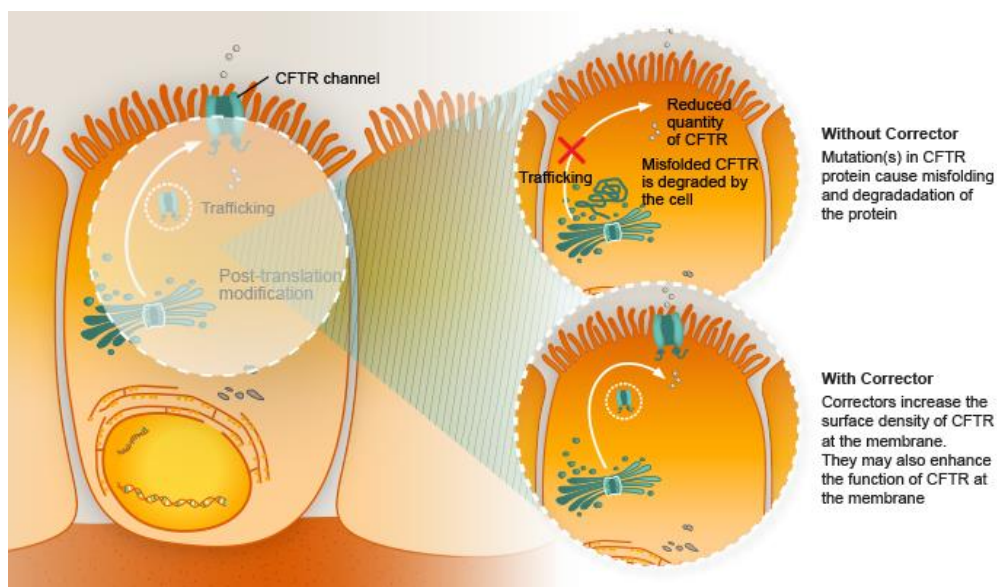
4.3.2. Ispravljačke molekule (eng. *Correctors*)

Ispravljači predstavljaju male molekule koje su usmjerene na stabilizaciju unutarstaničnog procesiranja i prijenosa mutiranog CFTR proteina primarno Klase II mutacija omogućujući porast njihove brojnosti na staničnoj površini (Slika 9.) (Brodie i sur., 2015). Najzastupljenija kvantitativna mutacijska promjena, Phe508del, koja je prisutna na barem jednom homolognom kromosomu u 85% ljudi oboljelih od cistične fibroze kategorizirana je u navedenu skupinu mutacija s preuranjenom unutarstaničnom degradacijom proteina u ER-u. Stoga su sami CFTR korektori dizajnirani tako da isprave problem u procesu smatanja proteina i njegovoj translokaciji. Na molekularnoj razini, postoje dva osnovna pristupa djelovanja ispravljačkih molekula koji mogu biti farmakološki šaperoni koji predstavljaju male molekule sa sposobnošću vezanja na CFTR ionski kanal i stabilizacije proteina, dok druga skupina uključuje proteostazne regulatore koji mogu blokirati degradaciju djelomično smotanih proteina na razini ER-a ili same plazmatske membrane (Vallières i Elborn, 2019).

Kao najznačajni primjer korektorskih molekula spominje se lumacaftor (VX-809) koji je u *in vitro* testiranjima pokazao efikasnost i selektivnost primjene uz reverziju funkcije CFTR proteina. Rezultati prekliničkih istraživanja sugeriraju da lumacaftor djeluje kao farmakološki šaperon na prvu transmembransku domenu CFTR proteina (TMD1) čime dolazi do djelomičnog popravka njegovog smatanja uz povrat potrebnog inteziteta interakcija između transmembranskih domena i nukleotid-vezujuće domene (De la Hoz i sur., 2019). Monoterapija lumacaftorom unatoč pozitivnih rezultata preliminarnih ispitivanja ipak nije dovoljno efikasna za samostalnu kliničku upotrebu te je ustanovljeno kako se uspješnost terapije može unaprijediti u kombinaciji s pojačivačkim agensima. Dualno djelovanje lumacaftora, koji ispravlja unutarstanično procesiranje uzrokovano Klasom II mutacija, s ivacaftorom koji pojačava transportnu funkciju proteina omogućuje da se protein nakon kombinirane terapije uspješno prenosi do apikalne strane stanica uz reverziju pravilne funkcije. Navedeni kombinirani terapijski pristup vrlo je atraktivan za primjenu na pacijentima s mutacijom Phe508del (Solomon i sur., 2015).

Tezacaftor (VX-661) jest drugi primjer modulatora koji funkcioniraju kao ispravljački agensi pri čemu su preklinička *in vitro* testiranja temeljno dala iste rezultate kao i lumacaftor uz karakteristični aditivni efekt u kombinaciji s ivacaftorom na povrat porasta aktivnosti kloridnog transporta (Solomon i sur., 2015). Ova kombinirana terapija preliminarno je pokazala najveću učinkovitost kod osoba koji su homozigoti za Phe508del i heterozigoti genotipa

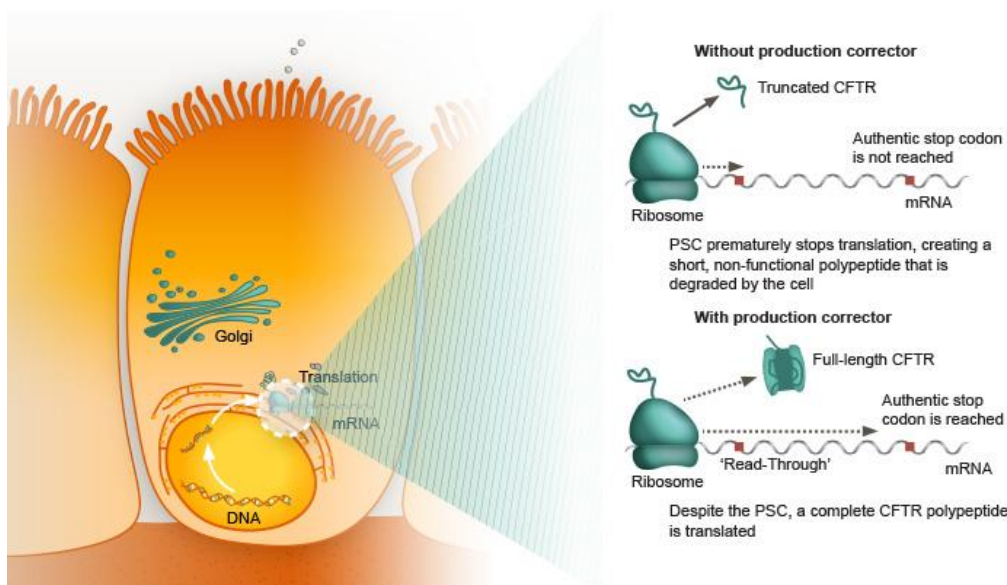
Phe508el/Gly551Asp (Brodie i sur., 2015). Ivacaftor te kombinirani lijekovi lumacaftor + ivacaftor i tezacaftor + ivacaftor trenutno su jedini modulatori koji su odobreni od strane Američke uprave za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*) te se upotrebljavaju u liječenju osoba oboljelih od cistične fibroze dok je još 11 lijekova u pripremnj fazi razvoja (De la Hoz i sur., 2019).



Slika 9. Mehanizam djelovanja ispravljačkih molekula (eng. *correctors*). Bez djelovanja korektorskih molekula određene mutacije *CFTR* gena uzrokuju nemogućnost pravilnog smatanja proteina i njegovu brzu degradaciju (gore). Djelovanjem ispravljačkih molekula povećava se količina nativnih proteina na membrani stanica jer se omogućuje formiranje ispravne konformacije proteina i njegove pravilne translokacije koja je praćena i potencijalnim povećanjem transportne aktivnosti (dolje). (Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.cftr.info/clinical-management-of-cf/cftr-modulators/potentiators-correctors-and-production-correctors/>).

4.3.3. Supresorski agensi (eng. *Read-through agents*)

Supresorski agensi predstavljaju terapijski pristup u liječenju mutacija Klase I kojim se potiče nastavak translacijskog procesa mRNA molekula omogućujući pritom veću sintezu CFTR proteina (Brodie i sur., 2015). Preuranjena terminacija translacije ili besmislene mutacije čine 5-10% svih *CFTR* mutacijskih promjena pri čemu ribosomski agensi djeluju tako da suprimiraju prijevremenu terminaciju translacije osiguravajući održavanje normalne duljine i strukture proteinskog produkta (Coutelle, 2015; De la Hoz i sur., 2019). Danas je poznato nekoliko tipova supresorskih agensa među kojima su najvažniji aminoglikozidi koji imaju sposobnost vezanja na ribosom i modifikacije prepoznavanja preuranjenog STOP kodona (PTC) čime se stimulira odabir tRNA molekula umjesto terminacijskih kompleksa (Vallières i Elborn, 2019). Takva strategija omogućava ribosomima da nastave translaciju preko besmislenih mutacija bez zaustavljanja procesa proteinske sinteze (Slika 10.). Jedan od najčešće primjenjivanih aminoglikozidnih antibiotika ove skupine jest gentamicin koji uzrokuje ugradnju aminokiseline na položaju terminacijskog kodona uz djelomičan povrat transportne funkcije CFTR-a. Međutim, unatoč tomu, klinički doprinosi ove metode ipak su ograničeni zbog potrebe za intravenoznom i intramuskularnom primjenom kao i nedovoljno učinkovitim staničnim efektom i potencijalnim formiranjem toksičnih produkata u bubrezima (Derichs, 2013). Ataluren (PTC124) kao primjer ne-antibiotskog, biološki dostupnog lijeka inicijalno je bio dizajniran kao supresorski agens međutim unatoč pozitivnim rezultatima prve dvije faze kliničkih ispitivanja, lijek se nije pokazao dovoljno učinkovitim u trećoj fazi kliničkih ispitivanja zbog nedovoljnog poboljšanja respiratorne funkcije kao i zbog redukcije ionskog transporta. Stoga je daljnji razvoj njegove primjene prekinut 2017. godine (De la Hoz i sur., 2019.). Trenutno ne postoje komercijalno dostupni lijekovi koji djeluju na Klasu I mutacija. Međutim, aktualni razvoj novih ne-aminoglikozidnih supresora kao i druge generacije aminoglikozida ostavlja nadu da će u narednim godinama oni pokazati efikasniji supresorski potencijal i smanjenu toksičnost u usporedbi s prvom generacijom homologa (Rowe i sur., 2011).



Slika 10. Mehanizam djelovanja supresorskih agensa/produksijskih ispravljača (eng. *read-through agents/production correctors*). Bez dodatka supresora preuranjeni STOP kodon uzrokuje sintezu skraćenih polipeptidnih lanaca bez funkcije (gore) dok tretman sa supresorskim agensima djeluje na kontinuiranu translaciju preko preuranjenih terminacijskih kodona formirajući time ispravne proteinske produkte (dolje). (Preuzeto i prilagođeno iz <http://www.cftr.info/clinical-management-of-cf/cftr-modulators/potentiators-correctors-and-production-correctors/>).

4.3.4. Amplifikatori (eng. *Amplifiers*)

Amplifikatori predstavljaju najmoderniji modulatorski pristup u liječenju cistične fibroze temeljeći svoje djelovanje primarno na aktivnosti malih molekula koje imaju ulogu u povećanju transkripcije uzrokujući time porast koncentracije mutatnih CFTR mRNA molekula, a sukladno tome i količine nefunkcionalnih CFTR proteinskih produkata koji postaju supstrati za djelovanje drugih modulatora poput pojačivača i ispravljača (Mijnders i sur. 2017). Amplifikatori samostalno ne ispravljaju niti povećavaju transportnu aktivnost CFTR ionskog kanala, međutim oni su i zamišljeni kao dodatni agensi u kombiniranoj trostrukoj terapiji s potencijatorom i korektorom pri čemu svaki od navedenih lijekova potencijalno djeluje na određenoj staničnoj razini omogućujući veći stupanj sinteze, pravilno smatanje proteina i povećani prijenos iona. Dva najpoznatija amplifikatora, fPTI-428 i PTI-CH, trenutno su u kliničkoj razvojnoj fazi koje provodi biotehnološka tvrtka *Proteostasis Therapeutics* te zasad pokazuju pozitivne rezultate bez vidljivih nuspojava u prve dvije faze ispitivanja u kombinaciji s ivacaftorom i lumacaftorom čak dvostruko povećavajući njihovo inicijalno dualno djelovanje

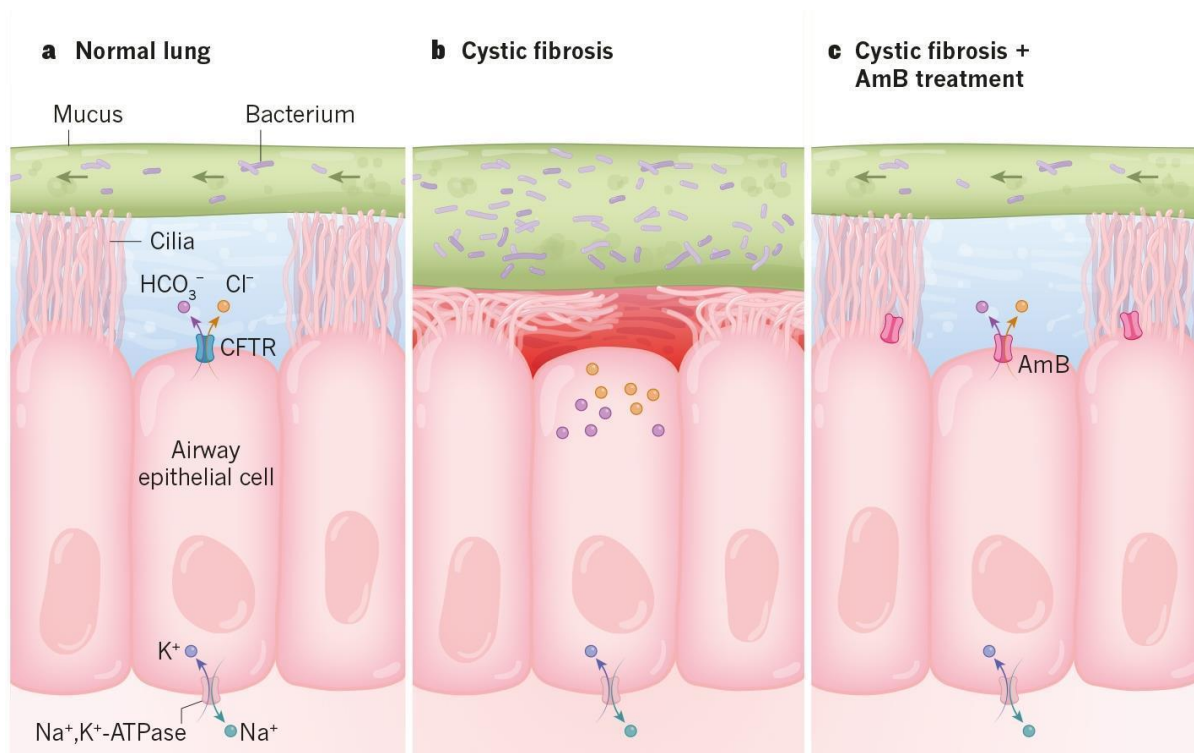
(<https://cysticfibrosisnewstoday.com/cftr-amplifiers/>). Navedeni agensi iznimno su važni za daljni terapijski razvoj jer mogu povećati efikasnost djelovanja ostalih modulatorskih molekula. Aditivni efekt tri agensa (potencijator + korektor + amplifikator) omogućuje stvaranje tzv. nove generacije modulatora koji konačno mogu istovremeno djelovati na različitim razinama sintetskog puta CFTR proteina omogućujući time da nefunkcionalni protein efikasno povрати normalnu funkcionalnost. (<https://www.cff.org/Research/Developing-New-Treatments/CFTR-Modulator-Types/>).

4.4. ZAMJENSKI IONSKI KANALI

Suvremeni molekularni terapijski pristupi danas pokušavaju riješiti problem negativnog učinka nefunkcionalnog CFTR proteinskog produkta i s aspekta uspostave pravilnog ionskog transporta i homeostaze elektrokemijskog gradijenta između lumena respiratornog sustava i odgovarajućih epitelnih stanica koristeći pritom alternativne prijenosne puteve negativno nabijenih iona iz citoplazme stanice zaobilazeći standardni prijenosni CFTR sustav kojemu je djelomično ili u potpunosti smanjena učinkovitost i djelotvornost. Takve alternativne opcije uključuju funkcionalne zamjenske ionske kanale koji mogu biti ili selektivni ionski kanali koji su normalno prisutni na apikalnoj strani epitelnih stanica respiratornog sustava ili pak sintetske molekule koje bi teorijski bile dizajnirane sa visokom specifičnošću i selektivnošću za prijenos odabranih aniona izvan stanične tekućine djelujući pritom kao umjetni anionski kanali ili prenositelji koji bi transportirali anione kroz lipidni dvosloj (Sheppard i Davis, 2019).

Značajan korak u navedenom smjeru i povratku funkcionalnosti elektrolitne ravnoteže respiratornog sustava alternativnim putem postigli su *Muraglia i suradnici, 2019.* demonstrirajući malu molekulu, amfotericin B, koja može formirati ionske kanale na apikalnoj membrani epitelnih stanica te povratiti nativni ionski transport i antibakterijski imunosni odgovor površinske respiratorne tekućine (Sheppard i Davis, 2019). Amfotericin B, prirodan protugljivični produkt bakterije *Streptomyces nodosus*, u početku je izazvao zabrinutost znanstvene javnosti o njegovoj upotrebi u terapijskom pristupu cistične fibroze s obzirom da stvara neselektivne ionske kanale koji su propusni za negativne, ali i pozitivne ione te mogu biti toksični za ljudske stanice uz mogućnost dodatne destabilizacije već narušene elektrokemijske ravnoteže, membranskog potencijala i pH vrijednosti sustava (Sheppard i

Davis, 2019). Međutim, tri eksperimentalna dokaza uvjerljivo sugeriraju prednost upotrebe upravo navedene molekule i predstavljaju važnu ishodišnu točku za mogući daljnji razvoj budućih terapijskih modela temeljenim na specifičnim sintetskim ionskim kanalima okarakteriziranim visokom selektivnošću za ciljani elektrolit. Prvi dokaz o upotrebljivosti amfotericina B jest da je njegova protugljivična aktivnost, koja se zasniva na mogućnosti molekule da ekstrahira sterolne molekule iz lipidne membrane, odvojena od njegove funkcije kao ionskog kanala (Anderson i sur., 2014) ukazujući da problem toksičnosti navedenog agensa može biti kontroliran njegovom koncentracijom (Sheppard i Davis, 2019). Drugo, dokazano je da amfotericin B može povratiti prijenosnu aktivnost kalijevih iona u stanicama kvasca kojima nedostaje kalijev ionski kanal (Cioffi i sur., 2015) što ukazuje kako navedena molekula može omogućiti i funkcionalnu zamjenu za fiziološki prirodno prisutan proteinski transporter. Konačan dokaz postavili su *Muraglia i suradnici, 2019.* demonstrirajući kako amfotericin B transportira bikarbonatne ione kroz sintetske lipidne membrane te atipične membrane ljudskih epitelnih stanica u *in vitro* uvjetima čime je narušeni elektrokemijski gradijent ponovno uspostavljen uz istovremenu sekreciju navedenih iona iz stanica, porasta pH vrijednosti površinske tekućine i povećanja fluidnosti i volumena same respiratorne tekućine (Slika 11.). Znanstvenici su također testirali epitelne stanice osoba s različitim varijantama i klasama mutacijskih promjena CFTR proteina što je dovelo do istih ishoda koji uključuju porast pH vrijednosti i pad viskoznosti respiratorne tekućine uz povećanje antibakterijske funkcije u usporedbi s netretiranim stanicama u kulturi (Sheppard i Davis, 2019). Sve navedene činjenice upućuju na dokaz koncepta da male molekule unatoč tome što ne mogu oponašati i u potpunosti zamijeniti sve funkcije kompleksnog proteina imaju izrazito visoku efikasnost u rješavanju poremećaja transporta iona.



Slika 11. Učinak amfotericina B (AmB) na povrat funkcije epitelnih stanica respiratornog sustava kod osoba oboljelih od cistične fibroze. Lijevo je prikazan primjer normalno funkcionirajućeg sustava prijenosa kloridnih i bikarbonatnih iona iz epitelnih stanica dišnih puteva u lumen respiratornog sustava osiguravajući održavanje funkcionalnosti površinske respiratorne tekućine i povezanog mukocilijarnog čišćenja bakterija i ostalih patogena. U sredini je prikazana narušena mukocilijarna aktivnost i porast mukoznog sloja kod osoba oboljelih od cistične fibroze zbog nemogućnosti transporta iona iz stanice. Desno je prikazan povrat funkcije stanica uslijed djelovanja amfotericina B koji preuzima i zamjenjuje funkciju CFTR proteina. (Preuzeto i prilagođeno iz Sheppard i Davis, 2019.)

5. ZAKLJUČAK

Identifikacija molekularne osnove cistične fibroze omogućila je razvoj suvremenih metoda terapija koje su usmjerene na povrat stanične funkcionalnosti respiratornog sustava pristupajući problemu na nekoliko razina genske ekspresije. Klasifikacija mutacijskih promjena na temelju strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti proteinskog produkta *CFTR* gena olakšala je razumijevanje sintetskog puta ionskog kanala i glavni uzrok velikog spektra simptomatskih poremećaja na molekularnoj razini. Evolucijski značaj pojavnosti cistične fibroze povezan s heterozigotnom otpornošću na određene bakterijske bolesti objašnjava današnju široku

rasprostranjenost i zastupljenost cistične fibroze te velikog broja *CFTR* alelnih varijanti. Široki spektar mutacija usmjerio je suvremene terapijske strategije više prema personaliziranom pristupu liječenja utemeljenom na točno određenom genotipu pacijenata što je sukladno tome omogućilo i povećanje standarda, kvalitete i dugotrajnosti života oboljelih osoba. Metode koje uvode ispravne alelne varijante do ciljnih stanica ili uključuju (ribo)proteinske komplekse za uređivanje genoma, ispravljaju i/ili pojačavaju aktivnost transportne funkcije CFTR proteina ili pak podrazumijevaju stimulaciju alternativnih prijenosnih puteva unosom zamjenskih ionskih kanala danas predstavljaju područja intenzivnog istraživanja. Takvi terapijski principi su u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima uspjeli pokazati izuzetno visoku sposobnost specifičnosti i specijaliziranosti individualiziranog pristupa u liječenju CF. Unatoč demonstriranoj primjenjivosti na pojedinim modelnim organizmima i stanicama u kulturi, navedene strategije ipak nailaze na određene probleme u smislu dizajna, transporta i djelovanja na točno ciljane stanice, dok nadilaženje biološko-fizikalanih barijera pojačanih fiziologijom bolesti, kao i aspekt financijske održivosti također trenutno spječava široku komercijalnu primjenu i široku primjenu u liječenju. Međutim, daljnji napredak u okvirima personalizirane medicine i molekularnih terapijskih pristupa omogućen je zbog činjenice da navedene terapijske tehnike omogućuju prevenciju razvoja simptoma cistične fibroze jer nastoje iskorijeniti bolest u samom začetku, na staničnoj razini smanjujući time stopu smrtnosti oboljelih osoba. Kako individualizirane metode napreduju prema genski usmjerenim terapijama bolja klasifikacija mutacijskih promjena novorođenčadi s dijagnosticiranom cističnom fibrozom imat će važnu ulogu u prognozi razvoja bolesti i staničnog odgovora na pojedine lijekove. Time će rana tipizacija pacijenata nužno morati postati medicinski standard te će značajno utjecati na sva buduća istraživanja i njihovu kliničku primjenjivost.

6. LITERATURA

- Alton, E. W., Boyd, A. C., Davies, J. C., Gill, D. R., Griesenbach, U., Harrison, P. T. i sur. (2016). Genetic medicines for CF: hype versus reality. *Pediatr. Pulmonol.*, 51, S5–S17.
- Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., ... Burke, M. D. (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, 10(5), 400–406.
- Brodie, M., Haq, I. J., Roberts, K. i Elborn, J. S. (2015). Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis. *Genome medicine*, 7, 101.
- Burney, T. J. i Davies, J. C. (2012). Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *The application of clinical genetics*, 5, 29–36.
- Chaudary, N. (2018). Triplet CFTR modulators: Future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14, 2375-2383.
- Cioffi, A. G., Hou, J., Grillo, A. S., Diaz, K. A., & Burke, M. D. (2015). Restored Physiology in Protein-Deficient Yeast by a Small Molecule Channel. *Journal of the American Chemical Society*, 137(32), 10096–10099.
- Clunes, M. T. i Boucher, R. C. (2007). Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug discovery today. Disease mechanisms*, 4(2), 63–72.
- Coutelle, C. (2015). A Paradigm-Shift in Molecular Therapy of Cystic Fibrosis? Gene Therapy versus Pharmacological Correction of Protein Function. *Gene Technology*, s1, e001.
- Davies, J. C., Alton, E. W. i Bush, A. (2007). Cystic fibrosis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 335(7632), 1255–1259.
- De la Hoz D., Villamil Osorio M. i Restrepo-Gualteros S. M. (2019). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: Present and future in cystic fibrosis treatment. A review. *Arch Argent Pediatr*, 117(2), e131-e136.
- Derichs, N. (2013). Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 22(127), 58-65.

- Donnelley, M., i Parsons, D. W. (2018). Gene Therapy for Cystic Fibrosis Lung Disease: Overcoming the Barriers to Translation to the Clinic. *Front. Pharmacol*, 9, 1381.
- E. Gabriel, S., N. Brigman, K., Koller, B., Boucher, R. i Stutts, J. (1994). Cystic Fibrosis Heterozygous Resistance to Cholera Toxin in the Cystic Fibrosis Mouse Model. *Science (New York, N.Y.)*, 266, 107-9.
- E. Goodman, B. i H. Percy, W. (2005). CFTR in cystic fibrosis and cholera: From membrane transport to clinical practice. *Advances in physiology education*, 29, 75-82.
- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., i Lukacs, G.L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *The Journal of biological chemistry*, 274 (31), 21873-7 .
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A. i sur. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245(4922), 1073–1080.
- Kirk, K. L. i Wang W. (2011). A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allostereism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem.*, 286, 12813–12819.
- Krvavac, A. i Nayak, R. P. (2016). New Horizons in Cystic Fibrosis - A Review. *JSM Gastroenterol Hepatol*, 4(2), 1059.
- Lopes-Pacheco, M. (2016). CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*, 7, 275.
- Mijnders, M., Kleizen, B. I Braakman, I. (2017). Correcting CFTR folding defects by small-molecule correctors to cure cystic fibrosis. *Current Opinion in Pharmacology*, 34, 83-90.
- Modiano, G., Ciminelli, B. M. i Pignatti, P. F. (2007). Cystic fibrosis and lactase persistence: a possible correlation. *Eur. J. Hum. Genet.*, 15(3), 255–259.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., ... Kádasi, L. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nature Genetics*, 7, 169-175.

- Moskowitz, S., L. Gibson, R. i L. Effmann, E. (2005). Cystic fibrosis lung disease: Genetic influences, microbial interactions, and radiological assessment. *Pediatric radiology*, 35, 739-57.
- Okiyoneda, T. i Lukacs, G. (2012). Fixing cystic fibrosis by correcting CFTR domain assembly. *The Journal of cell biology*, 199, 199-204.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S. S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M. J. i Colledge, W. H. (1998). Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature*, 393(6680), 79–82.
- Pittman, J. E. i Ferkol, T. W. (2015). The Evolution of Cystic Fibrosis Care. *Chest*, 148(2), 533–542.
- Rowe, S. M., Sloane, P., Tang, L. P. I sur. (2011). Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 89(11), 1149–1161.
- Sheppard, D. N. i Davis, A. P. (2019). Fighting cystic fibrosis with small molecules. *Nature*, 567, 315-317.
- Solomon, G. M., Marshall, S. G., Ramsey, B. W. i Rowe, S. M. (2015). Breakthrough therapies: Cystic fibrosis (CF) potentiators and correctors. *Pediatric pulmonology*, 50 Suppl 40(0 40), S3–S13.
- Tobacman, J. (2003). Does Deficiency of Arylsulfatase B Have a Role in Cystic Fibrosis?. *Chest.*, 123, 2130-2139.
- Vallièrès, E. i Elborn, S. (2014). Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *Advances in Genomics and Genetics*, 4, 161-172.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P. D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., ... Negulescu, P. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18825–18830.
- Xia, E., Zhang, Y., Cao, H., Li, J., Duan, R. i Hu, J. (2019). TALEN-Mediated Gene Targeting for Cystic Fibrosis-Gene Therapy. *Genes*, 10(1), 39.

http://www.cfgenetherapy.org.uk/genetherapy/article/CF_Gene_Therapy_Clinical_Trials
(pristupljeno 29.6.2019.)

<http://www.cftr.info/clinical-management-of-cf/cftr-modulators/potentiators-correctors-and-production-correctors/> (pristupljeno 7.7.2019.)

<https://cysticfibrosisnewstoday.com/cftr-amplifiers/> (pristupljeno 7.7.2019.)

<https://www.cff.org/Research/Developing-New-Treatments/CFTR-Modulator-Types/>
(pristupljeno 7.7.2019.)

<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> (pristupljeno 25.5.2019.)

<https://www.grepmed.com/images/61/modulatortherapy-cysticfibrosis-pathophys-mutations-pharm-cftr-pulm> (pristupljeno 7.7.2019.)

7. SAŽETAK

Identifikacija molekularne povezanosti između genske nefunkcionalnosti *CFTR* gena te patofiziološke i kliničke pozadine cistične fibroze omogućila je razvoj suvremenih terapijskih modela koji su primarno utemeljeni na individualiziranom pristupu oboljelima. Klasifikacija velikog spektra mutacijskih promjena postala je izuzetno važna komponenta u personaliziranoj medicini koja pokušava pristupiti svakom pojedinom pacijentu na specifičan način koji će omogućiti najefikasnije djelovanje molekularnih agensa usmjerenih na povrat izgubljene stanične funkcije mutiranih stanica primarno respiratornog sustava koji je temeljni uzrok visoke smrtnosti oboljelih osoba. Evolucijski značaj cistične fibroze te njezina velika populacijska zastupljenost potakla je značajan interes znanstvene zajednice u identifikaciji terapijskih strategija koje se ne temelje na liječenju simptoma već na genskoj terapiji i uređivanju genoma, modulatorskim molekulama koje pokušavaju povratiti pravilan unutarstanični transport i proteinsku funkciju CFTR-a te konačno zamjenskim ionskim kanalima koji uspostavljaju alternativne prijenosne puteve. Navedeni pristupi danas nailaze na mnoge zapreke u smislu dizajna, uspješnosti prijenosa i djelotvornosti kao i financijske održivosti, ali njihova visoka specifičnost i mogućnost značajnog smanjenja smrtnosti potiče njihov daljnji razvoj i budući napredak u klinici, komercijalnoj dostupnosti i primjenjivosti unutar područja personalizirane medicine.

8. SUMMARY

Identification of molecular association between genetic dysfunction of the *CFTR* gene and pathophysiological and clinical background of cystic fibrosis has enabled the development of modern therapeutic approaches that are becoming predominantly personalised. The precise classification of the whole spectrum of mutations has become an extremely important component in CF personalised medicine that attempts to approach each individual in a specific way that will allow the choice of the most efficient molecular agents. These agents are aimed at regaining the lost cellular function of mutated cells, primarily of respiratory system which represents the main cause of high mortality among people suffering from cystic fibrosis. Evolutionary significance of cystic fibrosis and its large prevalence in the population have led to a great interest of scientific community in identifying therapeutic strategies that are not based on treatments aimed at reducing symptoms but rather on gene therapy, genome editing and

application of modulator molecules. Along modulators, which attempt to restore normal intracellular transport and consequently protein function, replacement ion channels are also becoming an important therapeutic asset in activation of alternative transport pathways aiming to restore native cellular function. Nowadays, these approaches face many obstacles in aspects of drug design, transfer efficiency and effectiveness as well as financial sustainability but their high specificity and ability to significantly reduce mortality enables their further development and future progresses in clinical, commercial availability and applicability within personalized medicine.